

EXHIBIT 14



EC/ep

COMMITTEE DOCUMENT
NOT FOR PUBLICATION

PA/PH/Exp. 6/T (03) 43 ANP

BILINGUE

GROUP OF EXPERTS No. 6
(BIOLOGICAL SUBSTANCES)

Somatropin

Somatropine

Somatropinum

Monograph N°: 951

Cette monographie est soumise aux Autorités nationales pour commentaires et elle sera publiée simultanément dans le prochain numéro de Pharmeuropa (16.1).

This monograph is submitted to National Authorities for comment and will be simultaneously published in the next issue of Pharmeuropa (16.1).

Distribution

For action:

National Pharmacopoeia Authorities

For information :

Praesidium

Members of Group of Experts 6

Strasbourg

1 NOTE ON THE MONOGRAPH

2 As a result of a collaborative study involving manufacturers of somatropin and OMCLs
 3 (report of collaborative study available upon request from the Secretariat), it is proposed
 4 to replace the isoelectric method for the determination of isoform distribution by a
 5 capillary zone electrophoresis method. The reader's attention is drawn to the proposed
 6 specifications.

7 XXXX:0951

8

9

10 SOMATROPIN

11

12

Somatropinum

13

FPTIPLSRLF	DNAMLRRAHRL	HQLAFDTYQE	FEEAYIPKEQ
KYSFLQNPQT	SLCFSESIPT	PSNREETQQK	SNLELLRISL
LLIQSWLEPV	QFLRSVFANS	LVYGASDSNV	YDLLKDLEEG
IQTILMGRLED	GSVRTGQIFK	QTYSKFDTNS	HNDDALLKNY
GLLYCFRKDM	DKVETFLRIV	QCRSVEGSCG	F

14

15 $C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ 16 M_r 22 125

17

DEFINITION

22 Protein having the structure (191 amino-acid residues) of the major component of growth
 23 hormone produced by the human pituitary.

24 Content: 91.0 per cent to 105.0 per cent (anhydrous substance).

25 By convention, for the purpose of labelling somatropin preparations, 1 mg of anhydrous
 26 somatropin ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$) is equivalent to 3.0 IU of biological activity.

PRODUCTION

29 Somatropin is produced by a method based on recombinant DNA (rDNA) technology.

30 During the course of product development, it must be demonstrated that the
 31 manufacturing process produces a product having a biological activity of not less than
 32 2.5 IU/mg, using a validated bioassay based on growth promotion and approved by the
 33 competent authority.

34 Somatropin complies with the following additional requirements.

36 Host-cell-derived proteins. The limit is approved by the competent authority.

37 Host-cell- and vector-derived DNA. The limit is approved by the competent authority.

CHARACTERS

40 Appearance: white or almost white powder.

41

IDENTIFICATION

- 43 A. Examine the electropherograms obtained in the test for isoform distribution. In the
 44 electropherogram obtained with test solution (a), the principal band corresponds in
 45 position to that in the electropherogram obtained with reference solution (a).
- 46 A. Capillary electrophoresis (2.2.47) as described in the test for charged variants
 47 distribution with the following modification.

1 Injection: test solution (b); under pressure or vacuum, using the following sequence:
 2 sample injection (3 s) CZE buffer (1 s).

3 Results: in the electropherogram obtained, only 1 principal peak, corresponding to
 4 somatropin, is detected: no doubling of this peak is observed.

5 B. Examine the chromatograms obtained in the test for related proteins.

6 Results: the principal peak in the chromatogram obtained with the test solution is
 7 similar in retention time and size to the principal peak in the chromatogram obtained
 8 with the reference solution.

9 C. Peptide mapping (2.2.55).

10 **SELECTIVE CLEAVAGE OF THE PEPTIDE BONDS**

11 *Test solution.* Prepare a solution of the substance to be examined in 0.05 M
 12 *tris-hydrochloride buffer solution pH 7.5 R* to obtain a solution containing 2.0 mg/ml
 13 of somatropin and transfer about 1.0 ml to a tube made from suitable material such
 14 as polypropylene. Prepare a 1 mg/ml solution of *trypsin for peptide mapping R* in
 15 0.05 M *tris-hydrochloride buffer solution pH 7.5 R* and add 30 µl to the solution of
 16 the substance to be examined. Cap the tube and place in a water-bath at 37 °C for
 17 4 h. Remove from the water-bath and stop the reaction immediately, for example by
 18 freezing. If analysed immediately using an automatic injector, maintain at 2-8 °C.

19 *Reference solution.* Prepare at the same time and in the same manner as for the test
 20 solution but using *somatropin CRS* instead of the substance to be examined.

21 **CHROMATOGRAPHIC SEPARATION.** Liquid chromatography (2.2.29).

22 *Column:*

- 23 -- *size:* $l = 0.25 \text{ m}$, $\emptyset = 4.6 \text{ mm}$,
- 24 -- *stationary phase:* *octylsilyl silica gel for chromatography R* (5-10 µm),
- 25 -- *temperature:* 30 °C.

26 *Mobile phase:*

- 27 -- *mobile phase A:* dilute 1 ml of *trifluoroacetic acid R* to 1000 ml with *water R*,
- 28 -- *mobile phase B:* to 100 ml of *water R* add 1 ml of *trifluoroacetic acid R* and dilute
 29 to 1000 ml with *acetonitrile for chromatography R*,

34 Time	35 Mobile phase A (per cent V/V)	36 Mobile phase B (per cent V/V)
37 (min)	38	39
40 0 - 20	41 100 → 80	42 0 → 20
43 20 - 40	44 80 → 75	45 20 → 25
46 40 - 65	47 75 → 50	48 25 → 50
49 65 - 70	50 50 → 20	51 50 → 80
52 70 - 71	53 20 → 100	54 80 → 0
55 71 - 85	56 100	57 0

58 *Flow rate:* 1 ml/min.

59 *Detection:* spectrophotometer at 214 nm.

60 *Injection:* 100 µl.

61 *System suitability:* the chromatograms obtained with the test solution and the
 62 reference solution are qualitatively similar to the *Ph. Eur. reference chromatogram of
 63 somatropin digest*.

1 *Results:* the profile of the chromatogram obtained with the test solution corresponds
2 to that of the chromatogram obtained with the reference solution.

3 D. Examine the chromatograms obtained in the assay.

4 *Results:* the principal peak in the chromatogram obtained with the test solution is
5 similar in retention time and size to the principal peak in the chromatogram obtained
6 with the reference solution.

8 TESTS

9 **Related proteins.** Liquid chromatography (2.2.29): use the normalisation procedure.

10 *Test solution.* Prepare a solution of the substance to be examined in 0.05 M
11 *tris-hydrochloride buffer solution pH 7.5 R*, containing 2.0 mg/ml of somatropin.

12 *Reference solution.* Prepare a solution of *somatropin CRS* in 0.05 M *tris-hydrochloride*
13 *buffer solution pH 7.5 R*, containing 2.0 mg/ml of somatropin.

14 *Resolution solution (somatropin/desamidosomatropin resolution mixture).* Prepare a
15 solution of *somatropin CRS* in 0.05 M *tris-hydrochloride buffer solution pH 7.5 R* to
16 obtain a 2.0 mg/ml solution of somatropin. Either filter through a sterile filter or add
17 *sodium azide R* to a concentration of 0.1 mg/ml and allow to stand at room temperature
18 for 24 h.

19 *Maintain the solutions at 2-8 °C and use within 24 h. If an automatic injector is used,*
20 *maintain at 2-8 °C.*

21 *Column:*

- 22 – *size:* $l = 0.25 \text{ m}$, $\emptyset = 4.6 \text{ mm}$;
- 23 – *stationary phase:* a suitable singly end-capped butylsilyl silica gel, with a granulometry
24 of 5 μm and a porosity of 30 nm; a silica saturation column is placed between the pump
25 and the injector valve;
- 26 – *temperature:* 45 °C.

27 *Mobile phase:* *propanol R*, 0.05 M *tris-hydrochloride buffer solution pH 7.5 R* (29:71 V/V).

28 *Flow rate:* 0.5 ml/min.

29 *Detection:* spectrophotometer at 220 nm.

30 *Preconditioning of the column:* rinse with 200-500 ml of a 0.1 per cent V/V solution of
31 *trifluoroacetic acid R* in a 50 per cent V/V solution of *acetonitrile R*. Repeat as necessary,
32 to improve column performance.

33 *Injection:* 20 μl .

34 *Relative retention* with reference to somatropin: desamidosomatropin = about 0.85.

35 *System suitability:* resolution solution:

- 36 – *retention time:* somatropin = about 33 min; if necessary, adjust the concentration of
37 *propanol R* in the mobile phase;
- 38 – *resolution:* minimum 1.0 between the peaks due to desamidosomatropin and
39 somatropin;
- 40 – *symmetry factor:* 0.9 to 1.8 for the peak due to somatropin.

41 *Limits:*

- 42 – *total:* maximum 6.0 per cent.

1 Dimer and related substances of higher molecular mass. Size-exclusion chromatography
2 (2.2.30): use the normalisation procedure.

3 *Test solution.* Prepare a solution of the substance to be examined in 0.025 M phosphate
4 buffer solution pH 7.0 R, containing 1.0 mg/ml of somatropin.

5 *Reference solution.* Dissolve the contents of a vial of *somatropin CRS* in 0.025 M
6 phosphate buffer solution pH 7.0 R and dilute with the same solvent to obtain a
7 concentration of 1.0 mg/ml.

8 *Resolution solution.* Place 1 vial of *somatropin CRS* in an oven at 50 °C for a period
9 sufficient to generate 1-2 per cent of dimer (typically 12-24 h). Dissolve its contents in
10 0.025 M phosphate buffer solution pH 7.0 R and dilute with the same solvent to obtain a
11 concentration of 1.0 mg/ml.

12 *Column:*

- 13 – size: $l = 0.30\text{ m}$, $\varnothing = 7.8\text{ mm}$,
14 – stationary phase: *hydrophilic silica gel for chromatography R* of a grade suitable for
15 fractionation of globular proteins in the molecular mass range of 5000 to 150 000.

16 *Mobile phase:* 2-propanol R, 0.063 M phosphate buffer solution pH 7.0 R (3:97 V/V);
17 filter and degas.

18 *Flow rate:* 0.6 ml/min.

19 *Detection:* spectrophotometer at 214 nm.

20 *Injection:* 20 µl.

21 *Relative retention* with reference to somatropin monomer: related substances of higher
22 molecular mass = about 0.65; somatropin dimer = about 0.9.

23 *System suitability:* resolution solution:

- 24 – *retention time:* somatropin = 12 min to 17 min,
25 – *peak-to-valley ratio:* minimum 2.5, where H_p = height above the baseline of the peak
26 due to the dimer and H_v = height above the baseline of the lowest point of the curve
27 separating this peak from the peak due to the monomer.

28 *Limits:*

- 29 – *total of the peaks with retention times less than that of the principal peak:* maximum
30 4.0 per cent.

31 *Isoform distribution.* Examine by isoelectric focusing.

32 *Test solution (a).* Prepare a solution of the substance to be examined in 0.025 M
33 phosphate buffer solution pH 7.0 R, containing 2.0 mg/ml of somatropin.

34 *Test solution (b).* Add 0.1 ml of test solution (a) to 1.9 ml of 0.025 M phosphate buffer
35 solution pH 7.0 R.

36 *Reference solution (a).* Prepare a solution of *somatropin CRS* in 0.025 M phosphate
37 buffer solution pH 7.0 R, containing 2.0 mg/ml of somatropin.

38 *Reference solution (b).* Use an isoelectric point calibration solution in the pH range of 2.5
39 to 6.5, prepared and used according to the manufacturer's instructions.

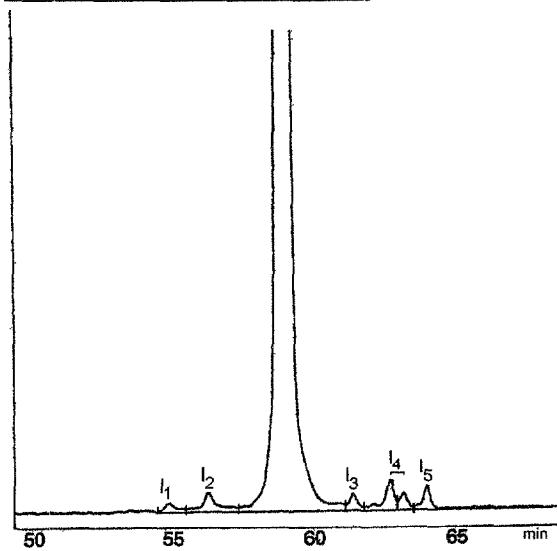
40 Operate the apparatus in accordance with the manufacturer's instructions. The isoelectric
41 focusing procedure may be carried out using a pre-cast gel 245 mm × 110 mm × 1 mm,
42 with a pH in the range 4.0 to 6.5. Apply to the gel 15 µl of each solution. Use as the anode
43 solution a 14.7 g/l solution of *glutamic acid R* in phosphoric acid (50 g/l H₃PO₄) and as
44 the cathode solution a 14.7 g/l solution of *lysine R* in phosphoric acid (50 g/l H₃PO₄).

1 the cathode solution an 89.1 g/l solution of *βalanine R*. Adjust the operating conditions
 2 to 2000 V and 25 mA. Allow focusing to take place for 2.5 h at a constant voltage and at a
 3 power of not more than 25 W. Immerse the gel for 30 min in a solution containing 115 g/l
 4 of *trichloroacetic acid R* and 34.5 g/l of *sulphosalicylic acid R*, and then for 5 min in
 5 a mixture of 8 volumes of *acetic acid R*, 25 volumes of *ethanol R* and 67 volumes of
 6 deionised *water R* (de-stain solution). Stain the gel by immersion in a 1.15 g/l solution of
 7 *acid blue 83 R* in de-stain solution at 60 °C for 10 min, and then place the gel in de-stain
 8 solution until excess stain is removed.

9 The test is not valid unless the distribution of bands in the electropherogram obtained
 10 with reference solution (b) corresponds to the manufacturer's indications. The
 11 electropherogram obtained with reference solution (a) contains a major band with
 12 an isoelectric point of approximately five, and a slightly more acidic minor band at
 13 approximately 4.8. In the electropherogram obtained with test solution (a), no band
 14 apart from the major band is more intense than the major band in the electropherogram
 15 obtained with test solution (b) (5 per cent).

16 **Charged variants distribution. Capillary zone electrophoresis (2.2.47).**

17 *The following chromatogram is shown for information but will not be published in*
 18 *the European Pharmacopoeia.*



36 **Figure 0951-1. – Representative electropherogram of somatropin**

37 *Test solution (a).* Prepare a solution of the substance to be examined containing 1 mg/ml
 38 of somatropin.

39 *Test solution (b).* Mix equal volumes of test solution (a) and the reference solution.

40 *Reference solution.* Dissolve the contents of a vial of *somatropin CRS* in *water R* and
 41 dilute with the same solvent to obtain a concentration of 1 mg/ml.

42 *Capillary:*

43 – *material:* uncoated fused silica,

44 – *size:* effective length = about 70 cm, Ø = 50 µm.

45 *Temperature:* 30 °C.

- 1 CZE buffer: 13.2 g/l solution of ammonium phosphate R adjusted to pH 6.0 with
2 phosphorous acid R and filtered.
- 3 Detection: spectrophotometer at 195 nm.
- 4 Set the autosampler to store the samples at 4 °C during analysis.
- 5 Preconditioning of the capillary: rinse with 1 M sodium hydroxide for 20 min, with
6 water R for 10 min and with CZE buffer for 20 min.
- 7 Between-run rinsing: rinse with 0.1 M sodium hydroxide for 2 min and with CZE buffer
8 for 6 min.
- 9 Injection: test solution (a) and the reference solution; under pressure or vacuum, using
10 the following sequence: sample injection (3 s) CZE buffer (1 s).
- 11 Migration: apply a field strength of 217 V/cm (20 kV for capillaries of 92 cm total length)
12 for 80 min, using CZE buffer as the electrolyte in both buffer reservoirs.
- 13 Relative migration with reference to somatropin: cleaved form = 0.94-0.98; Gln-18
14 somatropin = 1.02-1.06; deamidated forms = 1.06-1.11.
- 15 System suitability⁽¹⁾: reference solution:
- 16 – the electropherogram obtained is similar to the Ph. Eur. reference electropherogram
17 of somatropin. 2 peaks (I₁, I₂) eluting prior to the principal peak and 3 peaks (I₃, I₄, I₅)
18 eluting after the principal peak are clearly visible. Note: Peak I₂ corresponds to the
19 cleaved form; peak I₃ corresponds to Gln-18 somatropin and peak I₄ corresponds to
20 the deamidated forms, eluting as a doublet.
- 21 Limits:
- 22 – deamidated forms: maximum 5.0 per cent,
23 – any other impurity: for each impurity, maximum 2.0 per cent,
24 – total: maximum 10.0 per cent.
- 25 Water (2.5.32): maximum 10.0 per cent.
- 26 **Bacterial endotoxins (2.6.14):** less than 5 IU/mg, if intended for use in the manufacture
27 of parenteral dosage forms without a further appropriate procedure for removal of
28 bacterial endotoxins.
- 29 **ASSAY**
- 30 Size-exclusion chromatography (2.2.30) as described in the test for dimer and related
31 substances of higher molecular mass.
- 32 Calculate the content of somatropin ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$) from the peak areas in the
33 chromatograms obtained with the test solution and the reference solution and the
34 declared content of $C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ in *somatropin CRS*.
- 35 **STORAGE**
- 36 In an airtight container at a temperature of 2 °C to 8 °C. If the substance is sterile, store
37 in a sterile, airtight, tamper-proof container.
- 38 **LABELLING**
- 39 The label states, where applicable, that the substance is free from bacterial endotoxins.

40 (1) Readers are kindly requested to give a proposal on an acceptance criterion for repeatability of peak area.

1 NOTE RELATIVE À LA MONOGRAPHIE

2 Suite à une étude collaborative à laquelle ont participé des fabricants de somatropine et
 3 des OMCL (le rapport de l'étude est disponible sur demande auprès du Secrétariat), il est
 4 proposé de remplacer la méthode isoélectrique utilisée pour déterminer la distribution
 5 des isoformes par une électrophorèse capillaire de zone. L'attention des lecteurs est
 6 appelée sur les spécifications proposées.

7 XXXX:0951

8

9

10 SOMATROPINE

11

12

13 Somatropinum

14

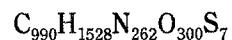
FPTIPLSRLF	DNAMLRRAHRL	HQLAFDTYQE	FEEAYIPKEQ
KYSFLQNPFQT	SLCFSESIPT	PSNREETQQK	SNLELLRISL
LLIQSWLLEPV	QFLRSVFANS	LVYGASDSNV	YDLLKDLEEG
IQTLMGRLED	GSPRTGQIFK	QTYSKFDTNS	HNDDALLKNY
GLLYCFRKDM	DKVETFLRIV	QCRSVEGSCG	F

15

16

17

18

 M_r 22 125

19

20

21 DÉFINITION

22 Protéine de même structure (191 résidus acides aminés) que le principal constituant de
 23 l'hormone de croissance produite par l'hypophyse humaine.

24 *Teneur* : 91,0 pour cent à 105,0 pour cent (substance anhydre).

25 Par convention, pour l'étiquetage des préparations de somatropine, 1 mg de somatropine
 26 anhydre ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$) correspond à 3,0 UI d'activité biologique.

27

28

29

30 PRODUCTION

31

32

33

34

35 La somatropine est produite par la méthode dite de l'ADN recombinant (ADNr). Pendant
 36 la phase de développement du produit, il doit être démontré, par une méthode de titrage
 37 biologique validée, fondée sur la stimulation de la croissance et ayant été approuvée par
 38 l'Autorité compétente, que le procédé de fabrication employé donne un produit dont
 39 l'activité biologique n'est pas inférieure à 2,5 UI/mg.

40

La somatropine satisfait également aux exigences suivantes.

41

Protéines issues de la cellule hôte. La limite est approuvée par l'Autorité compétente.

42

ADN issu de la cellule hôte et du vecteur. La limite est approuvée par l'Autorité
 43 compétente.

44

CARACTÈRES

45

Aspect : poudre blanche ou sensiblement blanche.

46

IDENTIFICATION

47

A. Examinez les électrophorégrammes obtenus dans l'essai de distribution des isoformes.
 La bande principale de l'électrophorégramme obtenu avec la solution à examiner (a) est
 semblable quant à sa position à la bande principale de l'électrophorégramme obtenu
 avec la solution témoin (a).

1 A. Electrophorèse capillaire (2.2.47) selon les indications de l'essai de distribution des
2 variants chargés avec la modification suivante.

3
4 Injection : solution à examiner (b) ; sous pression ou sous vide, selon la séquence
5 suivante : injection de l'échantillon (3 s), puis du tampon ECZ (1 s).

6
7 Résultats : dans l'électrophorégramme obtenu, 1 seul pic principal correspondant à la
8 somatropine est détecté : il n'est pas observé de dédoublement de ce pic.

9 B. Examinez les chromatogrammes obtenus dans l'essai des protéines apparentées.
10

11 Résultats : le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner
12 est semblable quant à son temps de rétention et ses dimensions au pic principal du
13 chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

14 C. Cartographie peptidique (2.2.55).

15 CLIVAGE SÉLECTIF DES LIAISONS PEPTIDIQUES

16
17
18 *Solution à examiner.* Préparez une solution de substance à examiner, dans de la
19 solution tampon tris-chlorhydrate pH 7,5 (0,05 M) R, contenant 2,0 mg/ml de
20 somatropine. Transvasez environ 1,0 ml de cette solution dans un tube constitué
21 d'un matériau approprié, par exemple du polypropylène. Préparez une solution de
22 trypsine pour cartographie peptidique R à 1 mg/ml dans de la solution tampon
23 tris-chlorhydrate pH 7,5 (0,05 M) R, puis ajoutez 30 µl de cette solution à la solution de
24 substance à examiner. Fermez le tube et placez-le dans un bain-marie à 37 °C pendant
25 4 h, puis sortez-le du bain-marie et stoppez immédiatement la réaction, par exemple
26 par congélation. Si l'analyse est effectuée immédiatement au moyen d'un injecteur
27 automatique, maintenez à 2-8 °C.

28
29 *Solution témoin.* Préparez la solution témoin au même moment et de la même manière
30 que la solution à examiner, mais en utilisant de la somatropine SCR au lieu de la
31 substance à examiner.

32
33 SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE. Chromatographie liquide (2.2.29).

34
35 Colonne :

- 36
37 -- dimensions : $l = 0,25 \text{ m}$, $\varnothing = 4,6 \text{ mm}$,
38
39 -- phase stationnaire : gel de silice octylsilylé pour chromatographie R (5-10 µm),
40
41 -- température : 30 °C.

42 Phase mobile :

- 43
44 -- phase mobile A : prélevez 1 ml d'acide trifluoracétique R et complétez à 1000 ml
45 avec de l'eau R,
46
47 -- phase mobile B : à 100 ml d'eau R, ajoutez 1 ml d'acide trifluoracétique R, puis
complétez à 1000 ml avec de l'acetonitrile pour chromatographie R,

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Intervalle (min)	Phase mobile A (pour cent V/V)	Phase mobile B (pour cent V/V)					
0 - 20	100 → 80	0 → 20						
20 - 40	80 → 75	20 → 25						
40 - 65	75 → 50	25 → 50						
65 - 70	50 → 20	50 → 80						
70 - 71	20 → 100	80 → 0						
71 - 85	100	0						

10 *Débit* : 1 ml/min.

11 *Détection* : spectrophotomètre à 214 nm.

12 *Injection* : 100 µl.

13 *Conformité du système* : les chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et
14 la solution témoin sont qualitativement semblables au *chromatogramme de référence*
15 de l'*hydrolysat de somatropine de la Ph. Eur.*

16 *Résultats* : le profil du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner correspond
17 à celui du chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

18 D. Examinez les chromatogrammes obtenus dans le dosage.

19 *Résultats* : le pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution à examiner
20 est semblable quant à son temps de rétention et ses dimensions au pic principal du
21 chromatogramme obtenu avec la solution témoin.

22 ESSAI

23 **Protéines apparentées.** Chromatographie liquide (2.2.29) : utilisez le procédé de
24 normalisation.

25 *Solution à examiner.* Préparez une solution de substance à examiner dans de la *solution*
26 *tampon tris-chlorhydrate pH 7,5 (0,05 M) R*, contenant 2,0 mg/ml de somatropine.

27 *Solution témoin.* Préparez une solution de *somatropine SCR* dans de la *solution tampon*
28 *tris-chlorhydrate pH 7,5 (0,05 M) R*, contenant 2,0 mg/ml de somatropine.

29 *Solution pour essai de résolution (mélange somatropine/désamidosomatropine).*

30 Préparez une solution de *somatropine SCR* dans de la *solution tampon tris-chlorhydrate*
31 *pH 7,5 (0,05 M) R*, contenant 2,0 mg/ml de somatropine. Filtrez sur un filtre stérile ou
32 ajoutez de l'*azide de sodium R* jusqu'à une concentration de 0,1 mg/ml, puis laissez
33 reposer à température ambiante pendant 24 h.

34 *Conservez les solutions à 2-8 °C et utilisez-les dans les 24 h. Si un injecteur automatique*
35 *est utilisé, maintenez-le à 2-8 °C.*

36 *Colonne* :

- 37 – *dimensions* : $l = 0,25 \text{ m}$, $\emptyset = 4,6 \text{ mm}$;
- 38 – *phase stationnaire* : gel de silice butylsilylé approprié, ayant subi un cycle de
39 post-greffage, d'une granulométrie de 5 µm et d'une porosité de 30 nm ; une colonne
40 de saturation remplie de gel de silice est placée entre la pompe et l'injecteur ;
- 41 – *température* : 45 °C.

42 *Phase mobile* : *propanol R*, *solution tampon tris-chlorhydrate pH 7,5 (0,05 M) R*
43 (29:71 V/V).

1 *Débit* : 0,5 ml/min.

2 *Détection* : spectrophotomètre à 220 nm.

3 *Préconditionnement de la colonne* : rincez la colonne avec 200-500 ml d'une solution
4 d'*acide trifluoracétique R* à 0,1 pour cent V/V dans une solution d'*acetonitrile R* à
5 50 pour cent V/V. Répétez cette opération, autant que nécessaire, afin d'optimiser les
6 performances de la colonne.

7 *Injection* : 20 µl.

8 *Rétention relative* par rapport à la somatropine : désamidosomatropine = environ 0,85.

9 *Conformité du système* : solution pour essai de résolution :

- 10 – *temps de rétention* : somatropine = environ 33 min ; ajustez si nécessaire la teneur en
11 *propanol R* de la phase mobile ;
- 12 – *résolution* : au minimum 1,0 entre les pics dus à la désamidosomatropine et à la
13 somatropine ;
- 14 – *facteur de symétrie* : 0,9 à 1,8 pour le pic dû à la somatropine.

15 *Limites* :

- 16 – *total* : au maximum 6,0 pour cent.

17 **Dimère et substances apparentées de masse moléculaire supérieure.** Chromatographie
18 d'exclusion (2.2.30) : utilisez le procédé de normalisation.

19 *Solution à examiner.* Préparez une solution de substance à examiner dans de la *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,025 M) R*, contenant 1,0 mg/ml de somatropine.

20 *Solution témoin.* Dissolvez le contenu d'une ampoule de *somatropine SCR* dans de la
21 *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,025 M) R*, puis complétez avec le même solvant de
22 façon à obtenir une concentration de 1,0 mg/ml.

23 *Solution pour essai de résolution.* Placez 1 ampoule de *somatropine SCR* à l'étuve à
24 50 °C pendant une durée suffisante (généralement 12-24 h) pour obtenir 1-2 pour cent de
25 dimère. Dissolvez son contenu dans de la *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,025 M) R*,
26 puis complétez avec le même solvant de façon à obtenir une concentration de 1,0 mg/ml.

27 *Colonne* :

- 28 – *dimensions* : $l = 0,30 \text{ m}$, $\emptyset = 7,8 \text{ mm}$,
- 29 – *phase stationnaire* : *gel de silice hydrophile pour chromatographie R* de qualité
30 appropriée pour le fractionnement des protéines globulaires de masse moléculaire
31 comprise entre 5000 et 150 000.

32 *Phase mobile* : 2-*propanol R*, *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,063 M) R* (3:97 V/V) ;
33 filtrez et dégazez.

34 *Débit* : 0,6 ml/min.

35 *Détection* : spectrophotomètre à 214 nm.

36 *Injection* : 20 µl.

37 *Rétention relative* par rapport au monomère de somatropine : substances apparentées de
38 masse moléculaire supérieure = environ 0,65 ; dimère de somatropine = environ 0,9.

39 *Conformité du système* : solution pour essai de résolution :

- 40 – *temps de rétention* : somatropine = 12 min à 17 min,

1 - rapport pic/vallée : au minimum 2,5 avec H_p = hauteur au-dessus de la ligne de base
 2 du pic dû au dimère et H_v = hauteur au-dessus de la ligne de base du point le plus bas
 3 du tracé entre ce pic et celui dû au monomère.

4
 5 **Limites :**

6
 7 - total des pics de temps de rétention inférieur à celui du pic principal : au maximum
 8 4,0 pour cent.

9 **Distribution des isoformes.** Examinez par focalisation isoélectrique.

10
 11 **Solution à examiner (a).** Dissolvez la somatropine dans de la *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,025 M) R* de façon à obtenir une solution contenant 2,0 mg/ml de somatropine.

12
 13 **Solution à examiner (b).** A 1,9 ml de *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,025 M) R*,
 14 ajoutez 0,1 ml de solution à examiner (a).

15
 16 **Solution témoin (a).** Dissolvez de la somatropine SCR dans de la *solution tampon phosphate pH 7,0 (0,025 M) R* de façon à obtenir une solution contenant 2,0 mg/ml de somatropine.

17
 18 **Solution témoin (b).** Utilisez une solution d'étalonnage des points isoélectriques couvrant un intervalle de pH de 2,5 à 6,5, préparée suivant les instructions du fabricant.

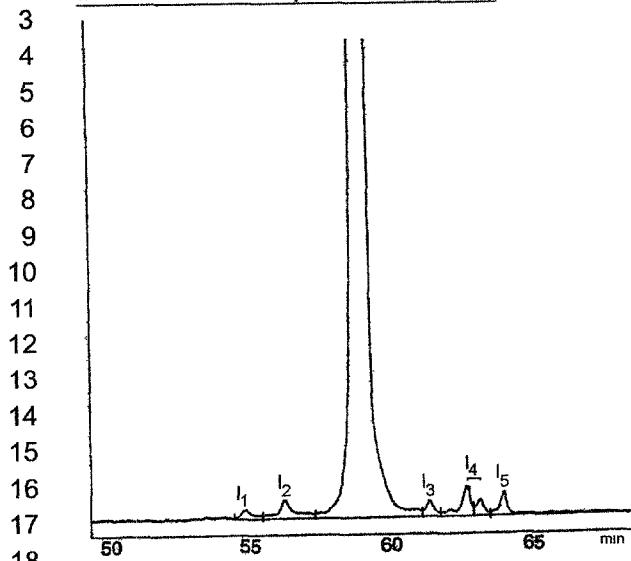
19
 20 Utilisez l'appareil suivant les instructions du fabricant. La focalisation isoélectrique peut être réalisée à l'aide de plaques de gel prêtes à l'emploi de 245 mm x 110 mm x 1 mm, couvrant un intervalle de pH de 4,0 à 6,5. Déposez sur la plaque 15 µl de chaque solution. Utilisez comme solution anodique une solution d'*acide glutamique R* à 14,7 g/l dans de l'*acide phosphorique (50 g/l H₃PO₄)*, et comme solution cathodique une solution de β -alanine R à 89,1 g/l. Ajustez les conditions opératoires à 2000 V et 25 mA.

21
 22 Laissez la focalisation se dérouler pendant 2,5 h sous tension constante et à une puissance ne dépassant pas 25 W. Immergez la plaque pendant 30 min dans une solution contenant 115 g/l d'*acide trichloracétique R* et 34,5 g/l d'*acide sulfosalicylique R*, puis pendant 5 min dans un mélange de 8 volumes d'*acide acétique R*, de 25 volumes d'*éthanol R* et de 67 volumes d'*eau R* désionisée (solution de décoloration). Placez la plaque pendant 10 min dans une solution de *bleu acide 83 R* à 1,15 g/l dans la solution de décoloration, chauffée à 60 °C, puis replongez-la dans la solution de décoloration jusqu'à élimination de l'excès de colorant.

23
 24 L'essai n'est valable que si la distribution des bandes de l'électrophorégramme obtenu avec la solution témoin (b) est conforme aux indications du fabricant. L'électrophorégramme obtenu avec la solution témoin (a) présente une bande principale au point isoélectrique 5 environ, et une bande secondaire légèrement plus acide au point isoélectrique 4,8 environ. Dans l'électrophorégramme obtenu avec la solution à examiner (a), aucune des bandes, à l'exception de la bande principale, n'est plus intense que la bande principale de l'électrophorégramme obtenu avec la solution à examiner (b) (5 pour cent).

25
 26 **Distribution des variants chargés.** Electrophorèse capillaire de zone (2.2.47).

1 Le chromatogramme suivant est présenté pour information mais ne sera pas publié
2 dans la Pharmacopée Européenne.



19 Figure 0951-1. - Electrophorégramme représentatif de la somatropine

20 Solution à examiner (a). Préparez une solution de la substance à examiner contenant
21 1 mg/ml de somatropine.

22 Solution à examiner (b). Mélangez des volumes égaux de solution à examiner (a) et de
23 solution témoin.

24 Solution témoin. Dissolvez le contenu d'une ampoule de somatropine SCR dans de
25 l'eau R et complétez avec le même solvant de façon à obtenir une concentration de
26 1 mg/ml.

27 Capillaire :

- 28 - matériau : silice fondue non recouverte,
- 29 - dimensions : longueur utile = environ 70 cm, Ø = 50 µm.

30 Température : 30 °C.

31 Tampon ECZ : solution filtrée de phosphate d'ammonium R à 13.2 g/l ajustée à pH 6.0
32 avec de l'acide phosphoreux R.

33 Détection : spectrophotomètre à 195 nm.

34 Programmez l'auto-échantillonneur pour conserver les échantillons à 4 °C au cours de
35 l'analyse.

36 Préconditionnement du capillaire : rincez le capillaire pendant 20 min avec de
37 l'hydroxyde de sodium 1 M, puis pendant 10 min avec de l'eau R et pendant 20 min
38 avec le tampon ECZ.

39 Rincage avant chaque analyse : rincez le capillaire pendant 2 min avec de l'hydroxyde de
40 sodium 0,1 M, puis pendant 6 min avec le tampon ECZ.

41 Injection : solution à examiner (a) et solution témoin ; sous pression ou sous vide, selon la
42 séquence suivante : injection de l'échantillon (3 s), puis du tampon ECZ (1 s).

1 Migration : appliquez pendant 80 min un champ électrique de 217 V/cm (soit 20 kV
 2 pour les capillaires d'une longueur totale de 92 cm), en utilisant le tampon ECZ comme
 3 solution électrolytique dans les 2 réservoirs de tampon.

4 Migration relative par rapport à la somatropine : forme clivée = 0,94-0,98 ; Gln-18
 5 somatropine = 1,02-1,06 ; formes désamidées = 1,06-1,11.

6 Conformité du système⁽¹⁾ : solution témoin :

7 – l'électrophorégramme obtenu est semblable à l'électrophorégramme de référence de
 8 la somatropine de la Ph. Eur. ; 2 pics (I_1, I_2) élués avant le pic principal et 3 pics ($I_3, I_4,$
 9 I_5) élués après le pic principal sont nettement visibles. Note : le pic I_2 correspond à
 10 la forme clivée, le pic I_3 à la Gln-18 somatropine et le pic I_4 aux formes désamidées,
 11 qui sont éluées sous forme de doublet.

12 Limites :

- 13 – formes désamidées : au maximum 5,0 pour cent,
- 14 – toute autre impureté : pour chaque impureté, au maximum 2,0 pour cent,
- 15 – total : au maximum 10,0 pour cent.

16 **Eau** (2.5.32) : au maximum 10,0 pour cent.

17 **Endotoxines bactériennes** (2.6.14) : moins de 5 UI/mg, si la somatropine est destinée à
 18 la préparation de formes pharmaceutiques administrées par voie parentérale sans autre
 19 procédé approprié d'élimination des endotoxines bactériennes.

20 DOSAGE

21 Chromatographie d'exclusion (2.2.30) selon les indications de l'essai du dimère et des
 22 substances apparentées de masse moléculaire supérieure.

23 Calculez la teneur en somatropine ($C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$) à partir de la surface des pics des
 24 chromatogrammes obtenus avec la solution à examiner et la solution témoin et de la
 25 teneur déclarée en $C_{990}H_{1528}N_{262}O_{300}S_7$ de la *somatropine SCR*.

26 CONSERVATION

27 En récipient étanche, à une température de 2 °C à 8 °C. Si la substance est stérile, elle est
 28 conservée en récipient stérile, étanche, à fermeture inviolable.

29 ÉTIQUETAGE

30 L'étiquette indique dans les cas appropriés, que la substance est exempte d'endotoxines
 31 bactériennes.

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

(1) Il est demandé aux lecteurs de proposer un critère d'acceptation pour la répétabilité de la surface des pics.